

超並列コンピュータを活用した Ligand-Based Drug Design

山乙 教之、中込 泉、広野 修一
北里大学 薬学部 創薬物理化学研究室

はじめに

基質や薬物などのリガンドが酵素や受容体などの標的タンパク質へ結合する関係は、鍵と鍵穴の関係として知られている。したがって、薬をデザインすることは、鍵穴に合った鍵を作ることに対応する。鍵の作り方、すなわち、ドラッグデザインの進め方は、2つのタイプに分類される。1つは、X線結晶解析やNMRにより求められたタンパク質立体構造、すなわち、鍵穴の形に基づいて、立体相補性、疎水相補性、静電相補性や水素供与・受容性を考慮して、鍵である薬をデザインする方法で、Structure-Based Drug Design 手法と呼ばれる。この方法は、極めて有効であるが、必ずしも標的タンパク質が明らかでない場合や、標的タンパク質の立体構造がまだ解かれていない場合が多く、いつでも可能なわけではない。もう1つの方法は、Ligand-Based Drug Design 手法と呼ばれる方法で、標的タンパク質の構造は未知であるが、作用が弱かったり、副作用があるなど薬として利用するには問題があるリガンド化合物が複数知られている場合に、利用できる方法である。この方法は、「同一のタンパク質の同一部位（鍵穴）に結合する化合物（鍵）には共通の構造特徴及び物理化学特性がある」という多くの研究者にとって物理化学的に納得のいく前提に基づいて、リガンド化合物の特徴抽出からファーマコホア情報を引き出すというものである。ここで、ファーマコホアとは、標的タンパク質との相互作用認識に必要な薬物分子の官能基等の物理化学的特徴の3次元空間的配置のことである。

手順としては、

- 1) 複数のリガンド化合物の立体配座集団の生成（マルチコピー高温分子動力学計算に基づく効率的な配座解析）
- 2) 官能基特性に基づく分子重ね合わせ法によるファーマコホアの抽出
- 3) 3次元構造活性相関モデルの作成

という、3つの段階を通してリガンド化合物の3次元構造特徴が抽出される。1)で生成される立体配座集団には活性配座が含まれていることが経験的に確かめられている。2)の分子重ね合わせ法では、前もっての原子の対応は要求されず、客観的にすべての重なりが調べられるという特徴を持つ。3)において、活性の強弱を説明する情報が得られる。この方法の詳細と応用例について以下に示す。

方法

高温分子動力学による配座サンプリング

CAMDAS (Conformational Analyzer with Molecular Dynamic and Sampling) [1]は、リガンド化

化合物の立体構造と分子力場のパラメータを与えるだけで、分子動力学(MD)計算を利用して、各リガンド化合物のエネルギー極小配座集団を自動的に生成することができる。CAMDAS version 2.1では、最初に、Distance Geometry法を用いて、入力構造から10個の初期構造を発生する(マルチコピー法)。そして、系の温度を高温にすることによって、配座間のエネルギー障壁を容易に乗り越え、その化合物が取りうる配座を網羅的に探索する。生成された立体配座は、CAMDAS内でエネルギー極小化され、さらに2面角を基準にクラスタリングされる。そして、多数のエネルギー的に安定な代表配座の集団が生成される。その際、水溶液中では通常存在しないリガンド分子内の水素結合を回避するために、分子力場の静電相互作用項と水素結合項を無視する中性力場を用いた。

分子配座の重ね合わせ(SUPERPOSE法)による結合配座抽出

SUPERPOSE法を用いた分子重ね合わせによる結合配座の抽出は、リガンド分子は多様な配座を採りうるが、結合配座はただ1つのみであり、多様なリガンド分子間で各配座同士を重ね合わせたとき、結合配座同士が最も良く重なるという前提に立っている。したがって、全てのリガンド分子が共通に重なる領域にある配座を求めれば、それが結合配座であることになる(図1)。

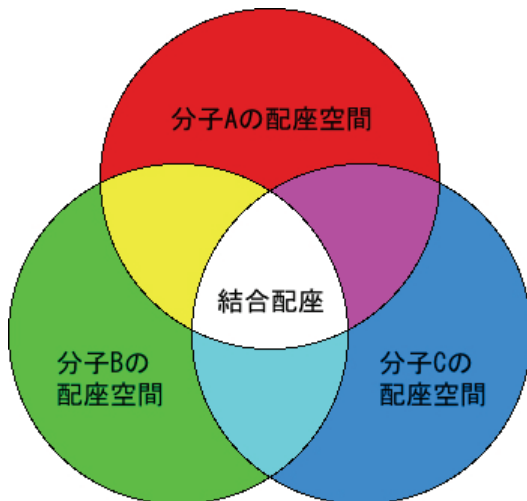


図1 結合配座抽出の概念図

特性球表現

リガンドが受容体や酵素などのタンパク質に結合して薬理活性を発現するには、活性に必須のファーマコホアさえあれば良いと考えられる。そこで、分子の官能基・原子団に特性球を置き、分子を簡略表記した(図2)。

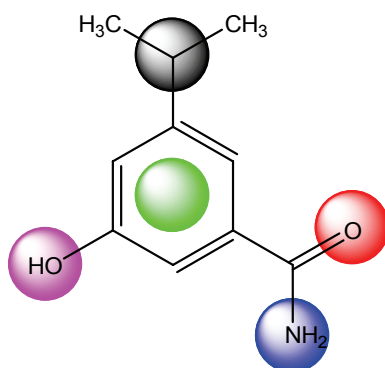


図2 分子の特性球表現

黒は、疎水性(HP)。青は、水素供与性(HD)。赤は、水素受容性(HA)。

紫は、水素供与/受容性(DA)。緑は、芳香族疎水性(AR)。

これにより、リガンド分子間の重ね合わせるべき点の数が減少するので、計算が効率化される。最初の SUPERPOSE 法[2, 3]では、疎水性(HP)、水素供与性(HD)、水素受容性(HA)、水素供与/受容性(DA)の 4 種類が使用された。しかしながら、疎水性原子団について、脂肪族炭素と芳香族炭素を区別していないため、リガンド-タンパク質相互作用において多く見られる芳香環スタッキングをうまく再現できないという問題が生じた。そこで、SUPERPOSE プログラム version 3 において、芳香環疎水性球(AR)と環の向きを規定するダミー球(DU)が新たに設けられた。現在、特性球の配置規則は、下記のように定義されている。

特性球の配置規則

1. カルボニル、スルホン、ホスホン、エステル、エーテル等の酸素原子は、水素受容性(HA)である。
 - a) CO_2^- 、 SO_2 、 PO_2^- 等の共鳴構造では、水素受容性球の半径は 0.5\AA である。
 - b) a)において、2つの酸素原子の間に 1\AA の水素受容性球を置くことも可能である。
2. 水酸基酸素原子、チオール硫黄原子は、水素供与/受容性(DA)で、半径は 1\AA である。
3. アミン、アミド、アミジン、グアニジン等の水素原子を伴った窒素原子は、水素供与性(HD)である。
 - a) アミジン等の共鳴構造では、水素供与性球の半径は 0.5\AA である。
 - b) a)において、2つの窒素原子の間に 1\AA の水素供与性球を置くことも可能である。
4. フェニル、ナフタレン、ピリジン、及びチオフェン等の芳香環は、芳香環疎水性である。
 - a) 芳香環中心部に、半径 1\AA の芳香環疎水性球(AR)を置く。
 - b) 環の法線ベクトル上、上下 1.9\AA 離れた場所に、半径 0.5\AA のダミー球(DU)を置く。
 - c) ARに加えて、2個の DUとも重なったとき、得点をさらに+1する。
5. 官能基としてのアルキル(チオエーテル含む)鎖長 3以上の脂肪鎖(枝分かれ含む)は、

疎水性である。

- a) 枝分かれている炭素原子に 1Å の疎水性球を置く。
 - b) 主鎖の付け根の位置から数えて 3 番目の位置の炭素原子に（付け根の原子は既に官能基としてアサインされていない事。アサインされているならば、その次の原子から数える）1Å の疎水性球を置く。
 - c) 極性基から炭素原子 2 個以上離れていなければ、疎水性球は置くことができない。
 - d) 疎水性球は、連続して置くことができない。（間に 2 原子を挟むこと）
 - e) ピペリジン環、ピロリジン環には、環の中心に 1Å の疎水性球を置くことができる。
6. トリフルオロメチル基は疎水性であり、中心の炭素原子に 1Å の疎水性球を置く。

同じタンパク質に結合する複数のリガンド分子の各配座間で特性球の重なりが、表 1 の得点表に基づいて評価され、最も得点の高い重なりが、結合配座として選択される。

表 1 特性球同士の重なりについての得点表

	HP	HD	HA	DA	AR	DU
HP	+3	-2	-2	-2	+3	0
HD	-2	+2	-2	+1	-2	0
HA	-2	-2	+2	+1	-2	0
DA	-2	+1	+1	+1	-2	0
AR	+3	-2	-2	-2	+3	0
DU	0	0	0	0	0	+1

重ね合わせアルゴリズム

通常、分子の重ね合わせには、最小二乗法が使用される。しかしながら、最小二乗法には、互いの分子内に重ね合わせる特性球が 3 点以上存在しなければならず、また、直線状に並んでいてはいけないという条件がある。しかしながら、基質特異性の低いトランスポーターや、活性の弱いリガンドでは、必須ファーマコホアが、2 点しかないという場合も考えられる。それに、幅広いリガンドと結合する様なタンパク質では、ファーマコホアが直線状に並んでいた方が、分子の軸に沿った回転を許容できるので、基質認識に有利である場合も考えられる。そこで、最小二乗法ではなく、並進と回転による空間探索による分子配座重ね合わせアルゴリズムを採用した。

岩瀬による最初の SUPERPOSE プログラムで用いられたアルゴリズムは、以下の通りである[2]。最初に、重ね合わせたい 2 つの分子の外接直方体体積を比較し、体積の大きい方を参照分子、小さい方を移動分子とする。次に、移動分子をその重心で刻み角 (10°) 毎に回転させ、その回転された移動分子の座標をメモリ上に保存する。そして、回転された移動分子の各座標について、参照分子の外接直方体内を 1Å 刻みで平行移動させる。ここで、

移動分子を最初に回転させて保存し、それを並進させるのは、計算量の大きい回転の回数を減らし、計算時間を短縮するためである。そして、得点表に基づいて特性球の重なり度を判定し、最高得点を与える 2 分子の重ね合わせを選択する。同点の場合には、正の得点を与える特性球の重なり度の平均二乗距離 (rmsd、式 1) の小さいものを選択する。

$$\text{rmsd} = \sqrt{\frac{\sum_{i,j}^{n_+} d_{ij}^2}{n_+}} \Lambda \quad (1)$$

ここで、 n_+ は、正の得点を与える特性球の重なり数の数、 d_{ij} は、特性球間の距離。最後に、rmsd を目的関数としてシンプレックス法を用いて、特性球の重なり度を改善する。

その後、プログラム的高速化のために、岩瀬と山乙との間で問題点が議論された。「外接直方体内を 1Å 刻みで、移動分子が当たってもなく移動するのは無駄である。なぜなら、活性を発現するためには、少なくとも 1 つのファーマコホア (特性球の重なり) が必要である。従って、参照分子内の正の得点を与える特性球上に、移動分子内の特性球を重ねる様に飛び飛びに平行移動すれば良い。」そこで、岩瀬の SUPERPOSE プログラム ver. 3 では、参照分子内の正の得点を与える特性球の周囲に、小さな立方体 (半径 0.5Å の特性球の場合、1 辺 1Å、半径 0.5Å の特性球では、1 辺 1.5Å) を作成し、その中心、頂点、面中心を重ね合わせ点として採用した。また、重ね合わせ精度を改善するために、以下の改良がなされた。参照/移動分子の判定のための外接直方体体積計算については、全原子を用いるのではなく、特性球のみとした。更に、移動分子の回転中心を重心ではなく特性球の座標中心とし、回転角も、参照分子の特性球を飛び越えてしまわない様に可変にした。

プログラムの並列化

1 配座対 1 配座の重ね合わせは、数分で終わる。しかしながら、分子が取り得る配座は、数百から数千あるので、2 分子を重ね合わせるには、数万から数百万配座同士の重ね合わせを実行せねばならず、並列計算が必要となる。最初、並列シェルを用いて、入力配座を CPU ごとに換えて、SUPERPOSE ver. 3 の多対多配座用サブプログラム COMBI を実行することにより並列計算が行われた。しかしながら、1 ノード当たり 1~2CPU の PC クラスタと異なり、超並列コンピュータでは 1 ノードに多数の CPU がある。その場合、一度に多数のファイルにアクセスするジョブを実行するとファイル IO を占有してしまい、ファイルの読み書き待ちになるという問題が生じた。そこで、最初に、入力配座をまとめて読み込んで、各 CPU に配分し、計算終了後に結果を 1 つにまとめて書き込む並列プログラムを作成することにした。並列化には、MPI ライブラリを採用した。また、FORTRAN 77 で書かれていたソースコードを Fortran 90/95 で全面的に書き直し、ループやデータ構造をコンパイラによ

る最適化が容易なように見直した。これは、山乙によって行われた。この並列プログラムは、SUPERPOSE ver. 3 の COMBI サブプログラムのアルゴリズムを基にしたので COMBI with MPI (COMBI_MPI)と名付けられた。

シンプレックス法の改良

岩瀬の SUPERPOSE 法のシンプレックス法の目的関数が単純な rmsd であることは、負の得点を与える特性球の重なりを回避し得ないという問題を生じる。そこで、SUPERPOSE ver. 3 では、シンプレックスサブルーチンの戻り値を選択するときのみ、最も得点が高いものを返している。しかしながら、シンプレックス法の探索過程における目的関数は、あくまで rmsd なので、本質的な解決になっていない。重ね合わせ得点を目的関数として、空間を探索すれば良いと思われるかもしれないが、SUPERPOSE 法の得点空間は、かなり離散的な整数空間なので、極めて収束が悪くなってしまふ。そこで、COMBI_MPI では、下式の得点関数と修正 rmsd 関数の合成関数をシンプレックス法の目的関数とした (式 2)。

$$\text{目的関数} = \sum_{i,j} \text{Score}(i,j) - \sqrt{\frac{\sum_{i,j}^{n_+} \frac{d_{ij}^2}{(r_i + r_j)^2}}{n_+} + \frac{\sum_{i,j}^{n_-} \frac{\{(r_i + r_j) - d_{ij}\}^2}{(r_i + r_j)^2}}{n_-}} \Lambda \quad (2)$$

ここで、第 1 項の Score は、表 1 の得点表に基づく得点関数、 r は、特性球半径、 n は、負の得点を与える特性球の重なりの数。第 2 項の修正 rmsd 関数は、正の得点を与える特性球の重なりは近付くように、負の得点を与える重なりは遠ざかるように働く。また、距離を 2 つの特性球半径の和で割ることで、修正 rmsd 関数の取り得る値を 0 から 1 の間に調整している。ここで、重なっていない特性球は、修正 rmsd 関数の計算に含まれないことに注意せよ。この新しい目的関数は、連続関数であり、切り上げるとオリジナルの得点関数を返す特徴がある。

ベンチマーク結果

超並列コンピュータ SR8000/MPP 上でのベンチマーク結果について、表 2 に示す。オリジナルの SUPERPOSE ver.3 COMBI に比べて、COMBI_MPI は、ループとデータ構造の最適化により、1CPU 実行時に、3.0 倍高速化された。8CPU での並列実行時では、SUPERPOSE ver.3 に比べて、16.8 倍も高速だった。COMBI_MPI での並列化効率は、8CPU 実行時、 $((16.8/3.0)/8)*100=70\%$ であった。

表2 超並列コンピュータ SR8000/MPP 上でのベンチマーク結果

プログラム	CPU 数	速度 (倍) ¹⁾
SUPERPOSE ver.3 COMBI	1	1.0
COMBI_MPI	1	3.0
	8	16.8

1) SUPERPOSE ver.3 COMBI での計算速度を 1.0 とする。

CoMFA 法による 3 次元定量的構造活性相関(3D-QSAR)

重なった特性球は、活性（基質の認識）に必須のファーマコホアを現していると考えられる。しかしながら、活性の強弱にかかわる情報は、通常その中に含まれない。そこで、得られた結合配座の重ね合わせ構造を使って、CoMFA 法（Comparative Molecular Field Analysis）[4]を行い、分子の周りの 3 次元空間と活性との相関モデルを作成した。CoMFA 法は、分子の周りに 3 次元格子を発生させ、各格子点にプローブを置き、プローブと全原子の間の相互作用を計算しそれを各格子点上の値として割当て、この値と活性との相関モデルを構築するものである。CoMFA 法は、活性の強弱に関する情報を与えるが、逆に、活性に必須な領域の相互作用フィールドに変動が少ないため、ファーマコホア情報はほとんど与えない。従って、SUPERPOSE 法と CoMFA 法は、相補的であるといえる。そこで、SUPERPOSE 法の段階で結合配座を 1 つに絞り込むことができない場合には、CoMFA モデルの予測能を基準にして、結合配座を決定することができる。

CoMFA フィールドの計算には、+1 の電荷を持った sp^3 炭素プローブを用いた。格子間隔は、2.0Å とした。CoMFA モデルの作成には、立体相互作用と静電相互作用の他、リガンド分子の疎水性指標である $\log P$ (n -オクタノール/水の分配係数)の計算値 $ClogP$ [5, 6]を使用した。

応用例

トランスポーターcMOAT/MRP2のリガンド化合物に対する 3 次元定量的構造活性相関解析

近年、医薬品開発におけるトランスポーター研究の重要性が強く認識されているが、トランスポーターの薬物結合部位の立体構造が決定されていないため、Structure-Based Drug Design 手法を適用することはできない。ここでは、Ligand-Based Drug Design 手法による計算法的トランスポーター研究の例として、立体配座解析および分子重ね合わせ法によるトランスポーターcMOAT/MRP2 に対するリガンド化合物の 3 次元構造特徴の抽出と 3D-QSAR について紹介する[7,8]。

ABC (ATP Binding Cassette)トランスポーターの中で有機アニオン系化合物の細胞外への排出に関与するトランスポーターとして cMOAT があげられる (cMOAT は MRP2 とも称される)。ABC トランスポーターはいずれも 1 分子間に 12 から 18 の膜貫通部位と 2 つのよく保存された ATP 結合領域をもち、ATP によって駆動あるいは制御される[9]。

cMOAT は主に肝臓での胆汁排泄機構、とくに胆管側膜から胆汁への化合物の排泄に関与しており、広範な基質特異性をもっている。この基質特異性を化合物の 3 次元構造の観点から分析し、その情報に基づき、cMOAT のリガンド結合部位の物理化学的構造特徴を理解することは、化合物の吸収や排泄等をコントロールする上で重要であり、体内動態的に有利な薬物を創出する際の有用な情報となる[10,11]。そこで、当研究室で開発された Ligand-Based Drug Design 手法を用いて、リガンド化合物が実際に cMOAT に結合している構造（結合配座）を推定し、cMOAT に対するリガンド化合物の 3 次元構造特徴を明らかにするとともに、cMOAT のリガンド結合部位モデルを検討した。

まず CAMDAS を用いて、ラット肝臓から調製された胆管側膜小胞(CMV)s)による K_m が文献[12]より既知である 16 化合物に対して、エネルギー極小配座集団を生成した。MD 計算は、中性力場を用いて、1200K の高温度で 800ps 行った。次に、CAMDAS により得られた立体配座集団の中から結合配座候補を選択するために SUPERPOSE 法を使用した。訓練セットのうち、結合親和性が高い上位 9 化合物を使用して結合配座候補を 2 配座に絞り込んだ。

こうして絞り込まれた 2 配座と残りの化合物を重ね合わせ、2 つの結合配座モデルを構築した。さらに、この 2 個の結合配座モデルに関して活性との相関を調べ、最終的な結合配座を決定するために、CoMFA 法を行った。結果を表 3 に示す。

表 3 結合配座モデルの CoMFA 結果

モデル		結合配座モデル 1		結合配座モデル 2	
力場		ST+EL	ST+EL+logP	ST+EL	ST+EL+logP
Cross-validated	q^2	0.03	0.01	0.36	0.59
	S_{press}	1.21	1.15	0.80	0.64
成分数		7	6	3	3
PLS	r^2	1.00	1.00	0.99	0.99
	F	30122.1	2114.3	485.7	613.3
	s	0.01	0.03	0.09	0.08
寄与率(%)	ST	56.6	53.1	60.2	63.0
	EL	43.4	40.5	39.8	33.4
	logP	-	6.4	-	3.6

ST: 立体相互作用, EL: 静電相互作用

2 個の結合配座モデルを用いて CoMFA 法を行った結果、CoMFA モデルの予測性の指標である q^2 値に注目すると、全体的に結合配座モデル 2 の方が q^2 値が高かった。したがって、結合配座モデル 2 を cMOAT の結合配座として決定した (図 3)。

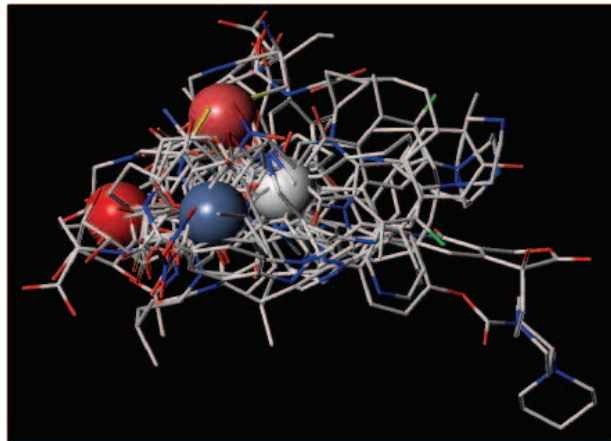
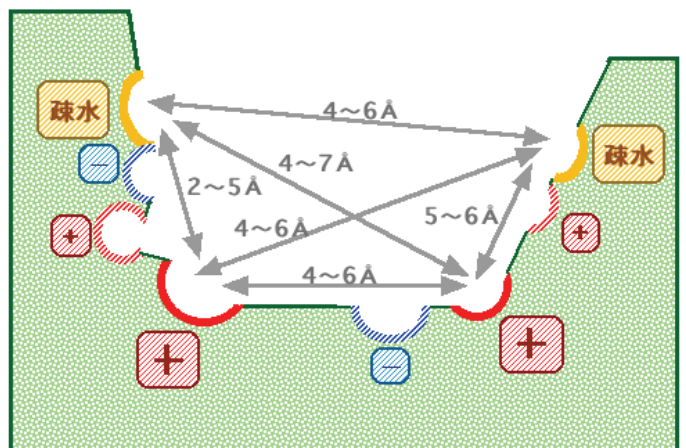


図3 cMOAT の結合配座

赤色の球は、水素受容性球。白色および灰色の球は、疎水性球。

さらに、重ね合わせにより得られたファーマコホア情報（活性発現に必要な官能基の空間配置情報）と CoMFA 解析から得られた等高線図（立体相互作用と静電相互作用）の情報を基に、cMOAT におけるリガンド結合部位の推定を行った（図4）。



- 正に荷電していると思われる領域
- 負に荷電していると思われる領域
- 疎水性に富んでいると思われる領域
- 主要結合サイト
- 副次的結合サイト

図4 cMOAT のリガンド結合部位の推定図

本研究で得られた知見は、薬物動態的に有利な薬を創出するうえで重要であり、この研究から得られた結合配座モデルと cMOAT のリガンド結合部位の情報を用いて、種々の化合物の *in silico* スクリーニングが可能になると考えられる。

QT 延長性薬物に対する 3 次元構造上の特徴抽出

本手法の 2 番目の応用として、QT 延長を引き起こす薬物に関して、標的タンパク質結合時における薬物分子の立体構造上の特徴抽出の実際について紹介する[13]。

手順としてはまず、エネルギー計算を行ってコンフォーマー集団の生成を行う。その集団に対して前述の官能基の特性球表現という単純化を行い、特性球の重ね合わせを行って各リガンド分子に共通に重なる特性球を拾い出していく。こうして拾い出された特性球に対応した原子団、官能基が QT 延長作用にかかわる原子団であろうと考えられ、そのような官能基の 3 次元配置を決定する。これが QT 延長作用を示す 3 次元ファーマコホアになる。我々は 8 種類の K⁺チャネルブロッカーを用いて検討した。それぞれの薬物に対して、CAMDAS を用いて配座解析を行い、SUPERPOSE 法により結合配座を決定し、QT 延長作用に関する 3 次元ファーマコホアを得た。最後に QT 延長作用を持たないモサプリドと比較した。

得られた QT 延長作用性薬物 8 種の分子特性球の重ね合わせが図 5 である。

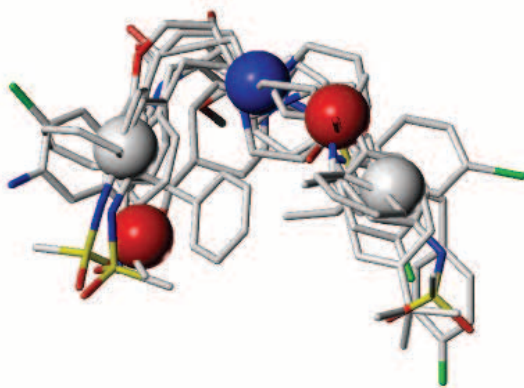


図 5 QT 延長作用のある 8 つの分子の特性球による重ね合わせ

青色の球は、水素供与性球。赤色の球は、水素受容性球。白色の球は、疎水性球。

分子は特徴的な曲がったコンフォメーションをとっており、このような空間的配置をしているもののみが K⁺チャネルブロッカーとしての機能を発現するものと考えられる。

次にモサプリドがなぜ QT 延長作用を持たないのか論理的に説明するために、構造的にモサプリドと似ているが QT 延長作用を持つシサプリドと比較した。

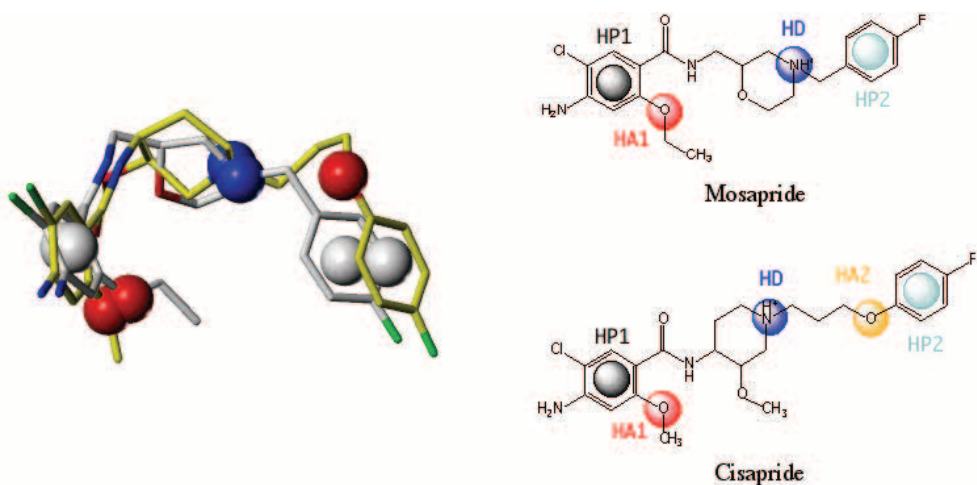


図6 モサプリドとシサプリドの構造比較

SUPERPOSE 法を用いて、モサプリドとシサプリドを重ね合わせてみると、水素受容性球 HA2 に対応する原子団が存在しないことが明らかになった (図6)。このことにより、モサプリドは QT 延長作用を持たないと考えられる。

結論

トランスポーターcMOAT/MRP2 のリガンドと K^+ チャネルブロッカー類の 2 例について、我々の研究室で開発してきた Ligand-Based Drug Design 手法の 1 つである CAMDAS/SUPERPOSE/CoMFA 法を検証した結果、その有用性が確認された。網羅的重ね合わせ手法であり、最も計算時間のかかる SUPERPOSE プログラムの並列化と最適化を行った結果、超並列コンピュータを利用する優位性が確立された。

参考文献

- 1 Tsujishita, H., Hirono, S., *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **11**, 305-315 (1997).
- 2 Iwase, K., Hirono, S., *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **13**, 499-512 (1999).
- 3 Hirono, S., Iwase, K., US Patent, 6,070,127 (2000).
- 4 Cramer, R.D., Patterson, D.E., Bunce, J.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5959-5967 (1998).
- 5 Hansch, C., Leo, A., *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, Wiley, New York (1979).
- 6 Leo, A., Hoekman, D., *Perspec. Drug Discovery Des.*, **18**, 19-38 (2000).
- 7 中込泉, 今井梨恵, 広野修一, 前田和哉, 楠原洋之, 杉山雄一, *Jpn. Pharmacol. Ther. (薬理と治療)*, **31**, S-143-S-150 (2003).
- 8 Hirono, S., Nakagome, I., Imai, R., Maeda, K., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., *Pharm Res.*, **22**,

- 260-269 (2005).
- 9 石川智久, *蛋白質核酸酵素*, **42**, 1285-1294 (1997).
 - 10 鈴木洋史, 杉山雄一, *蛋白質核酸酵素*, **42**, 1273-1284 (1997).
 - 11 伊藤晃成, 鈴木洋史, 杉山雄一, *腎と透析*, 臨時増刊号, 243-248 (1998).
 - 12 Suzuki, H., Sugiyama, Y., in *Membrane Transporters as Drug Targets (Pharmaceutical Biotechnology, V. 12)*, Amidon, G.L., Sadee, W., Eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 387-439 (1999).
 - 13 広野修一, *Ther. Res. (セラピューティック・リサーチ)*, **21**, 1309-1317 (2000).